



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 5 : C12Q 1/68		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 91/1981
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR91/00468 (22) Date de dépôt international: 11 juin 1991 (11.06.91)		(11) Numéro de publication internationale: (43) Date de publication internationale: 26 décembre 1991 (26.12.91)	
(30) Données relatives à la priorité: 90/07249 11 juin 1990 (11.06.90) FR		(74) Mandataire: TONNELLIER, Jean-Claude; Cabinet Non & Cie, 29, rue Cambacérès, F-75008 Paris (FR).	
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): BIO MERIEUX [FR/FR]; F-69280 Marcy-l'Etoile (FR).		(81) Etats désignés: AT (brevet européen), AU, BE (brevet européen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FI, FI (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US	
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): CROS, Philippe [FR/FR]; 90 E, rue du Cdt-Charcot, F-69005 Lyon (FR). ALLIBERT, Patrice [FR/FR]; 18, Les Granges, F-69290 Grézieu-la-Varenne (FR). MALLET, François [FR/FR]; 11, avenue Roberto-Rossellini, F-69100 Villeurbanne (FR). MABILAT, Claude [FR/FR]; 1, cours Emile-Zola, F-69100 Villeurbanne (FR). MANDRAND, Bernard [FR/FR]; 21, rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne (FR).		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification de revendications, sera republiée si de telles modifications sont requises.</i>	
(54) Title: METHOD FOR DETECTING A NUCLEOTIDE SEQUENCE BY SANDWICH HYBRIDIZATION (54) Titre: PROCEDE DE DETECTION D'UNE SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE SELON LA TECHNIQUE D'HYBRIDATION SANDWICH			
(57) Abstract <p>A method for detecting a single-stranded nucleotide sequence in a sample which is known or thought to contain it, using sandwich hybridization comprising the step of incubating the sample with a capture probe which is passively fixed to a solid support and with a detector probe which is labelled with a non-radioactive marker. The capture and detector probes can hybridize with two non-overlapping regions respectively of the target nucleotide sequence being sought. The incubation step is followed by a washing step for removing reagents which have not been fixed by hybridization. The method is characterized in that the capture probe contains 9-30 nucleotides and is fixed to said solid support which is made of a material based on a hydrophobic compound. The method can be used particularly for diagnosing infectious or genetic diseases and for cell typing.</p>			
(57) Abrégé <p>Procédé de détection d'une séquence nucléotidique simple brin dans un échantillon la contenant ou susceptible de la contenir, selon la technique d'hybridation sandwich comportant une étape d'incubation de l'échantillon avec une sonde de capture fixée de façon passive sur un support solide et une sonde de détection marquée avec un marqueur non radioactif, les sondes de capture et de détection étant capables d'hybridation, respectivement, avec deux régions non chevauchantes de la séquence nucléotidique-cible recherchée, et l'étape d'incubation étant suivie d'une étape de lavage pour éliminer les réactifs non fixés par hybridation, caractérisé par le fait que la sonde de capture contient de 9 à 30 nucléotides et est fixée sur ledit support solide constitué par un matériau à base d'un composé hydrophobe. Application notamment au diagnostic des maladies infectieuses ou génétiques ainsi qu'au typage cellulaire.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

**Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures
publiant des demandes internationales en vertu du PCT.**

AT	Autriche	ES	Espagne	MC	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MN	Mongolie
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	GR	Grèce	NO	Norvège
BR	Brésil	HU	Hongrie	PL	Pologne
CA	Canada	IT	Italic	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Licchtenstein	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

-1-

Procédé de détection d'une séquence nucléotidique selon la technique d'hybridation sandwich

La présente invention a pour objet un procédé de détection d'une séquence nucléotidique simple brin dans un échantillon la contenant ou susceptible de la contenir, selon la technique d'hybridation sandwich. Ce procédé est applicable notamment au diagnostic des maladies infectieuses ou génétiques, ainsi qu'au typage cellulaire.

On sait que l'une des propriétés caractéristiques des acides nucléiques est la possibilité d'interagir avec une séquence complémentaire par l'intermédiaire de liaisons hydrogène et de former ainsi un hybride stable selon les lois d'appariement A-T et G-C.

Un acide nucléique peut donc être utilisé comme sonde pour mettre en évidence, dans un échantillon, une séquence nucléique (appelée "cible") contenant une séquence complémentaire de celle de la sonde. Le marquage de l'hybride formé entre la cible et la sonde permet la détection et la quantification de la cible dans l'échantillon. Cette technique a été utilisée par SOUTHERN E.M. pour l'analyse de fragments d'ADN après séparation par gel d'électrophorèse : J. Mol. Biol 98,503 (1975).

Une modification de cette technique, qui présente notamment l'avantage de ne pas nécessiter la purification de l'échantillon contenant la cible, consiste à utiliser un protocole dit "sandwich". Une première sonde nucléotidique (sonde de capture) fixée sur un support solide sert à capter le gène ou le fragment de gène à détecter dans l'échantillon. Une deuxième sonde (sonde de détection), complémentaire d'une autre région de la cible permet la détection par l'intermédiaire d'un marqueur tel qu'un marqueur radioactif ; voir par exemple DUNN A.R. et HASSEL J.A., Cell, 12, 23, (1977) ; RANKI M. et al., Gene, 21,77 (1983) ; PALVA A. et al., FEMS Microbiol. Lett. 23,83 (1984) ; POLSKY-CYNKIN R. et al., Clin. Chem. 31, 1438 (1985).

La méthode d'hybridation sandwich peut être réalisée en ajoutant en une seule étape l'échantillon à analyser et la sonde de détection dans un conteneur où se trouve la sonde de capture fixée sur le support. Il s'agit dans ce cas de la méthode d'hybridation

-2-

sandwich dite "simultarée" ; voir par exemple les articles de RANKI et al., PALVA et al., POLSKY-CYNKIN et al., déjà cités.

La technique d'hybridation sandwich peut également être effectuée en deux étapes ; voir par exemple LANGDALE J.A. et al., Gene 36 201 (1985) et ZOLG J.W. et al., Mol. Biochem. Parasitol, 22,145 (1987).

Pour permettre l'utilisation de ces techniques d'hybridation dans des essais de routine, il est nécessaire de s'affranchir du marquage radioactif de la sonde de détection. On a proposé dans ce but divers systèmes faisant appel par exemple à un haptène reconnu par un anticorps, ou par une protéine affine. On a proposé en particulier diverses méthodes de marquage d'ADN ou d'ARN par la biotine ou ses dérivés ; voir notamment les demandes de brevet européen 0285057, 0285058, 0286898 et 0097373 ; FORSTER et al., Nucleic Acid Res. 13,745 (1985) ; CHOLLET A. et KAWASHIMA E.H., Nucleic Acid Res. 13,1529 (1985) ; CHIN B.C. et al., Nucleic Acid Res. 11,6513 (1983) ; COCUZZA A.J., Tetrahedron Lett. 30,6287 (1989). Toutefois, les systèmes de détection utilisant des méthodes de marquage non radioactif manquent encore de sensibilité ; voir par exemple ZOLG et al., article cité.

Par ailleurs, le diagnostic des maladies génétiques, le typage cellulaire et même dans certains cas l'identification de virus mutants nécessitent la détection de mutations ponctuelles dans le génome. Dans de tels cas, la mise au point de sondes de capture suffisamment sensibles pour détecter une mutation ponctuelle dans la région de la cible complémentaire de la séquence de la sonde de capture, est difficile. Les systèmes de sondes commercialisés actuellement pour réaliser ce type de détection sont peu pratiques car chaque système commercial doit être mis en oeuvre à une température donnée qui varie avec le système utilisé, ce qui empêche de faire des déterminations variées en opérant sur des appareils automatiques travaillant à une température unique.

La présente invention a pour objet un procédé de détection de séquences nucléiques, selon la technique d'hybridation sandwich, ayant une sensibilité suffisante pour permettre l'utilisation d'une sonde de détection non radioactive. Cela est rendu possible grâce à l'utilisation de sondes de capture de très courte taille dont on a

découvert qu'elles confèrent au test sandwich une grande spécificité tout en conservant une bonne sensibilité, et qu'elles permettent de détecter et de différentier des séquences homologues à un nucléotide près. L'utilisation d'oligo-nucléotides de courte taille facilite la construction des sondes en grande quantité avec un rendement acceptable, et permet de disposer d'un grand éventail de sélectivités. Cela est particulièrement utile dans le cas du typage HLA où les mutations définissant le type cellulaire sont localisées sur de courtes portions du gène.

On a en outre découvert qu'il est possible de réaliser l'adsorption passive directe, sur un support polymère tel que le polystyrène, de sondes oligo-nucléotidiques de très courte taille (jusqu'à un minimum de 11 nucléotides), ainsi que la fixation passive de sondes encore plus courtes (jusqu'à un minimum de 9 nucléotides) par l'intermédiaire d'une protéine à laquelle la sonde est liée de façon covalente. Il s'agit d'un résultat surprenant puisque jusqu'à présent, on utilisait généralement, comme sondes de capture, des séquences comportant plus de 100 bases (généralement plusieurs centaines de bases), et aussi puisque les séquences oligo-nucléotidiques (dT)₁₅ ne se fixent pas de façon passive (c'est-à-dire par adsorption) sur le polystyrène ; voir LACY M.J. et VOSS E.W., J. of Immunol. Methods, 116, 87-98 (1989). D'autres auteurs cherchaient à favoriser la fixation de la sonde de capture en saturant le support de polystyrène avec du poly(dT)₄₀₀₀ et en couplant la sonde de capture, comportant plusieurs dizaines de bases, à une "queue" de poly(dA) ayant de 30 à plus de 100 motifs ; voir MORRISSEY D.V. et COLLINS M.L., Molecular and Cellular Probes, 3, 1 89-207 (1989). Selon l'expérience de la demanderesse, la saturation du support solide par du poly(dT) n'améliore pas la détection.

En outre, grâce à l'utilisation de sondes de courte taille procurant une sensibilité accrue, le procédé de l'invention permet de choisir à volonté une température de travail prédéterminée, et de construire dans chaque cas des sondes de longueur adaptée pour pouvoir effectuer les déterminations des cibles les plus diverses à une même température de travail prédéterminée. On conçoit aisément la simplification de procédure et les possibilités d'automatisation qui en résultent.

-4-

La présente invention a donc pour objet un procédé de détection d'une séquence nucléotidique simple brin dans un échantillon la contenant ou susceptible de la contenir, selon la technique d'hybridation sandwich avec une sonde de capture fixée de façon passive sur un support solide et une sonde de détection marquée avec un marqueur non radioactif, les sondes de capture et de détection étant capables d'hybridation, respectivement, avec deux régions non chevauchantes de la séquence nucléotidique-cible recherchée, caractérisé par le fait que la sonde de capture, contenant de 9 à 30 nucléotides, notamment de 9 à 25 nucléotides, et en particulier de 9 à 20 nucléotides, est fixée de façon passive sur ledit support solide qui est réalisé en matériau hydrophobe.

Lorsque la sonde de capture contient au moins 11 nucléotides, il est généralement possible de la fixer de façon non spécifique (c'est-à-dire par adsorption) sur le support, généralement réalisé en polymère hydrophobe tel que le polystyrène ou un copolymère à base de styrène, notamment un copolymère butadiène-styrène ou analogue. Parmi les copolymères de styrène, on citera ceux qui contiennent au moins 10% en poids de motifs styrène, et en particulier ceux qui contiennent au moins 30%, en poids, de motifs styrène. Le matériau constituant le support solide utilisé selon l'invention peut en outre être constitué d'un mélange de polystyrène et/ou de copolymère de styrène (en particulier butadiène-styrène) avec un autre polymère permettant notamment d'améliorer les propriétés du support solide (propriétés mécaniques, transparence, etc ...). Ledit autre polymère est par exemple un polymère styrène-acrylonitrile, styrène-méthacrylate de méthyle, un polypropylène, un polycarbonate ou analogue. Le mélange de polymères constituant le support solide contient alors au moins 10 % en poids, et de préférence au moins 30 % en poids, de motifs styrène. On peut utiliser comme support solide un support conique commercialisé par VITEK (USA) et réalisé avec le matériau copolymère butadiène-styrène tel que celui vendu sous la dénomination commerciale K-Resin.

Il est également possible et, lorsque la sonde de capture est très courte (en particulier avec moins de 11 nucléotides), il devient même nécessaire, de mettre en œuvre des moyens permettant d'améliorer la fixation de la sonde de capture sur le support solide.

-5-

Comme indiqué précédemment, on peut par exemple lier la sonde de capture, de façon covalente, selon des méthodes connues en soi, à une protéine qui se fixe elle-même de façon passive sur le support (réalisé avec les matériaux déjà cités). Bien entendu, la protéine favorisant la fixation de la sonde de capture ne doit pas interférer avec la détection ; par exemple, lorsque la sonde de détection est marquée avec une enzyme, la protéine fixée sur le support solide ne doit pas avoir d'activité enzymatique interférente. Parmi les protéines que l'on peut utiliser pour la fixation passive indirecte de la sonde de capture sur le support, on peut citer l'albumine de mammifère (par exemple l'albumine bovine) ou une toxine protéique bactérienne telle que la toxine tétanique. De préférence, on choisira une protéine et/ou une méthode de couplage permettant de fixer une ou deux molécules de la sonde de capture par molécule de protéine.

Le couplage entre l'oligo-nucléotide et la protéine peut être réalisé par exemple par l'intermédiaire d'un bras alkylène ayant 3 à 12 atomes de carbone, qui peut être ajouté à l'extrémité 5' de l'oligo-nucléotide constituant la sonde de capture, lors de la synthèse automatique. Ce bras porte une fonction amine primaire qui, après activation, grâce à un agent de couplage homobifonctionnel comme le DITC(phénylème-1,4-diisothiocyanate), le DSS(disuccinimidyl subérate) ou le DIBS(acide 4,4'-diisothiocyanato stilbène 2,2'-disulfonique), permet le greffage sur les fonctions NH₂ portées par les lysines de l'albumine. Le conjugué est purifié par chromatographie liquide haute performance sur une colonne échangeuse d'ions. On a constaté que la fixation passive de la sonde de capture par l'intermédiaire d'une protéine, comme indiqué ci-dessus, est très avantageuse, notamment car elle fournit des résultats ayant un degré élevé de reproductibilité.

La sonde de détection peut elle-même être une sonde courte, contenant de 9 à 30 nucléotides. Toutefois, pour assurer la spécificité désirée, la sonde de détection contient de préférence au moins 15 nucléotides, par exemple de 15 à 30 nucléotides, lorsque la sonde de capture est très courte et contient en particulier moins de 15 nucléotides. La sonde de détection est couplée de façon covalente à un marqueur non radioactif, par exemple une enzyme. Le couplage

-6-

covalent est effectué selon les méthodes connues, en particulier par la méthode décrite ci-dessus pour le couplage entre l'oligonucléotide constituant la sonde de capture et une protéine. On peut utiliser comme marqueur enzymatique notamment une peroxydase telle que la peroxydase de raifort, une phosphatase alcaline, une phosphatase acide, la bêta-galactosidase, la glucose oxydase, etc.

Bien entendu, pour construire les sondes de capture et de détection, il est nécessaire de connaître la séquence ou une partie de la séquence de la cible, ou de connaître la séquence ou une partie de la séquence de la protéine codée par la cible. On peut alors synthétiser les oligo-nucléotides constituant les sondes avec un appareil de synthèse automatique d'ADN tel que les modèles 380 et 381 commercialisés par APPLIED BIOSYSTEMS.

Les sondes de capture et/ou de détection peuvent être constituées d'ADN ou d'ARN.

En outre, les sondes utilisées selon l'invention peuvent contenir ou être constituées par des alpha-nucléotides analogues des nucléotides naturels ; voir notamment le brevet français 2 607 507. Les alpha-nucléotides peuvent être obtenus sur synthétiseurs automatiques. Ils sont dérivables aux extrémités 3' ou 5' et se couplent aux protéines de la même manière que les bêta-oligo-nucléotides. Ils présentent l'avantage d'une bonne stabilité vis-à-vis des nucléases (voir THUONG N.T. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 84,5129 (1987). Les conjugués alpha-oligonucléotide-enzymes sont plus stables en solution que les analogues bêta et permettent des conservations plus longues à des dilutions plus faibles.

L'acide nucléique à détecter (cible) peut être de l'ADN double brin, de l'ADN simple brin, un hybride ADN-ARN ou bien de l'ARN (ribosomal ou messager). Bien entendu, dans le cas d'une cible nucléique à double brin, ou d'un hybride ADN-ARN, il convient de procéder à sa dénaturation avant la mise en oeuvre du procédé de détection par la technique d'hybridation sandwich. L'ADN double brin peut lui-même être obtenu après extraction, selon les méthodes connues, des acides nucléiques d'un échantillon à examiner. Cette extraction peut être faite par protéolyse de cellules suivie d'une extraction au phénol-chloroforme (voir par exemple MANIATIS et Coll.,

"Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, New-York (1982), ou plus directement par traitement alcalin en présence de détergent et/ou par traitement aux ultra-sons, ou par tout autre procédé libérant les acides nucléiques en phase liquide. L'échantillon à traiter peut contenir un mélange de cellules, bactéries, levures, virus ou autre micro-organismes. L'ADN double brin ainsi obtenu peut être utilisé directement, après dénaturation selon les techniques connues, ou bien peut être utilisé comme matrice pour l'amplification d'acides nucléiques afin d'obtenir des quantités suffisantes pour permettre la détection.

Pour obtenir la forme simple brin à partir d'un hybride ARN-ADN ou d'un ADN double brin, on peut opérer par dénaturation physique, chimique ou enzymatique. Une des méthodes physiques de dénaturation correspond à la séparation des deux brins en chauffant l'hybride jusqu'à ce qu'il soit totalement dénaturé, par exemple à une température de 80 à 105°C pendant quelques secondes à quelques minutes. La méthode chimique de dénaturation consiste par exemple à mettre en contact l'échantillon double brin avec une solution 0,2M d'hydroxyde de sodium pendant 10 minutes, ce traitement étant suivi d'une neutralisation par l'acide acétique à la même concentration (0,2M), jusqu'à obtention d'un pH compris entre 6 et 8. Une méthode enzymatique de dénaturation consiste en l'utilisation d'une hélicase. Les techniques d'utilisation des hélicases sont décrites notamment par RADDING, Ann. Rev. Genetics, 16, 405-437 (1982). D'autres enzymes ayant la même fonction sont utilisables dans le même but.

Le procédé de l'invention est de préférence effectué selon la méthode simultanée.

Cette méthode comprend :

- la fixation passive de la sonde de capture oligonucléotidique sur le support solide, directement ou par l'intermédiaire d'une protéine, comme indiqué précédemment ; on opère par mise en contact du support avec une solution aqueuse contenant la sonde ;

- le rinçage du support et le séchage éventuel pour sa conservation ;

- la mise en contact simultanée du support ainsi obtenu avec une solution contenant l'échantillon à analyser et avec une

-8-

solution contenant la sonde de détection oligonucléotidique marquée, l'échantillon et la sonde de détection pouvant être ajoutés sous forme de mélange ou séparément ;

- l'incubation du mélange obtenu ;
- le rinçage du support pour éliminer les constituants non fixés sur le support par hybridation ;
- et la détection qualitative ou quantitative à l'aide d'une réaction de révélation du marqueur fixé sur le support, par exemple par colorimétrie, fluorescence ou luminescence.

On va donner ci-après un mode de réalisation particulier, non limitatif, de la mise en oeuvre du procédé de l'invention.

1. Fixation de la sonde de capture

La fixation de la sonde de capture est obtenue en déposant par exemple 100 µl dans chaque puits d'une plaque de microtitration d'une solution contenant de 0,1 µg/ml à 10 µg/ml d'oligonucléotides de préférence 1 µg/ml, sous la forme d'une solution dans un tampon PBS 3X (0,45 M NaCl, 0,15 M phosphate de sodium, pH 7,0).

On laisse la plaque en contact avec la solution de sondes de capture pendant au moins 2 heures à 37°C, puis on la lave avec une solution de PBS 1X (NaCl 150 mM, tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 7,0, contenant 0,5% de Tween 20).

2. Incubation simultanée des échantillons et de la sonde de détection marquée

Les échantillons (cible) sont déposés sur la plaque après avoir subi si nécessaire le traitement de dénaturation ; sous la forme d'une solution dans le tampon PBS 3X contenant de l'ADN hétérologue, par exemple de l'ADN de sperme de saumon à 10µg/ml.

La sonde marquée est diluée dans le tampon précédent à une concentration de 20 à 100 µg/ml. On dépose 50 µl de cette solution dans le puits contenant la cible.

La plaque de microtitration est alors incubée pendant un temps pouvant varier par exemple entre 30 et 120 minutes à la température choisie, par exemple 37°C ou moins longtemps si une faible sensibilité est requise.

3. Lavage

On effectue par exemple le lavage avec du tampon PBS 1X contenant 0,5 % Tween 20 (Merk 82 21 84).

-9-

4. Révélation enzymatique

La révélation est effectuée avec le substrat correspondant à l'enzyme utilisée. Par exemple, on peut ajouter de l'orthophénylène diamine (OPD) dans le cas où le marqueur est la peroxydase de raifort du paranitrophénylphosphate (PNPP) ou du méthyl-5 umbelliferyl phosphate (MUP) dans le cas où la marqueur est la phosphatase alcaline.

Le temps de révélation du substrat est compris généralement entre 1 et 30 minutes après quoi la réaction est stoppée par addition de NaOH 1N dans le cas de la phosphatase alcaline, ou de H₂SO₄ 1N dans le cas de la peroxydase de raifort.

On effectue la lecture sur un lecteur de microplaques, à 405 nm pour le PNPP, à 492 nm pour l'OPD et en fluorescence pour le MUP (excitation 340 nm, émission 460 nm).

On revient ci-après sur les stades d'incubation et de lavage consécutif qui constituent des étapes-clés du procédé d'hybridation sandwich. Ces opérations d'incubation et de lavage sont chacune effectuées à une température constante comprise entre 20 et 60°C, et de préférence entre 25 et 40°C. L'un des avantages essentiels de l'utilisation de sondes courtes est de permettre la réalisation de tests sandwich pour la détection de cibles différentes en opérant, pour ces diverses déterminations, à une température unique prédéterminée, qui sera de préférence 37°C puisque tous les laboratoires d'analyses sont équipés d'appareils thermostatés réglés à cette température.

On sait que les hybrides d'ADN ont une température de dissociation qui dépend du nombre de bases hybridées (la température augmentant avec la taille de l'hybride) et qui dépend également de la nature des bases hybridées et, pour chaque base hybridée, de la nature des bases adjacentes.

La dissociation des hybrides se produit sur un intervalle de quelques °C et peut être facilement déterminée en spectroscopie UV : en effet, la densité optique de l'hybride est inférieure à celle des séquences monobrin correspondantes. Il est donc possible de déterminer dans chaque cas une température de demi-dissociation caractéristique de l'hybride étudié.

-10-

La connaissance de l'entropie et de l'enthalpie de réaction permet d'ailleurs de calculer (loi de Vant'Hoff) la température de demi-dissociation d'un hybride donné dans des conditions standards (par exemple dans une solution de salinité correspondant à NaCl 1M) en fonction de la concentration totale en acide nucléique dans la solution ; voir par exemple Breslauer K.J. et al., PNAS, 83, 3476 (1986); RYCHLIK W. et RHOADS R.E., Nucl. Acid. Res. 17, 8543 (1989) ; et FREIER S.M. et al., PNAS 83, 9373, 1986.

En pratique, il est toujours possible de déterminer expérimentalement la température de demi-dissociation de l'hybride formé par une sonde donnée avec la cible de séquence complémentaire, par de simples expériences de routine.

La température d'hybridation du protocole sandwich (température d'incubation et/ou température de lavage) devra évidemment être choisie en-dessous de la température de demi-dissociation, faute de quoi la cible ne s'hybriderait pas avec la sonde de capture et/ou de détection et les résultats du test seraient erronés.

Il est bien entendu que les considérations présentes sur la température de demi-dissociation concernent l'hybride le moins stable (c'est-à-dire celui ayant la température de demi-dissociation la plus basse) des deux hybrides que forme la cible avec d'une part la sonde de capture et d'autre part la sonde de détection. En effet, pour que le protocole sandwich puisse fonctionner correctement, il est évidemment nécessaire dans le cas où l'on recherche un résultat positif, que ces deux hybrides soient stables à la température à laquelle on opère.

Une mutation ponctuelle entraînant un mésappariement portant sur une seule paire de bases dans l'hybride, entraîne une modification, généralement un abaissement, de la température de demi-dissociation.

Un avantage essentiel résultant de l'utilisation de sondes courtes est qu'un tel mésappariement unique peut entraîner un abaissement relativement important de la température de demi-dissociation, de l'ordre de 2 à 4°C. Cela n'est pas le cas avec les sondes longues, où un tel mésappariement unique n'entraîne d'une très faible variation de la température de demi-dissociation.

-11-

On a maintenant découvert qu'il est possible de tirer avantage de l'utilisation de sondes courtes pour effectuer des déterminations selon le protocole sandwich à une température unique prédéterminée, par exemple 37°C comme indiqué ci-dessus.

Dans ce qui suit, on va raisonner à titre d'exemple sur le cas, généralement préféré, où c'est la sonde capture qui donne avec la cible recherchée un hybride moins stable que l'hybride cible-sonde de détection. Mais il est évident que l'on peut aussi adopter un système où inversement, c'est l'hybride sonde de détection-cible qui est le moins stable (il suffirait de remplacer alors dans ce qui suit l'expression "sonde de capture" par "sonde donnant avec la cible l'hybride le moins stable" pour adapter le raisonnement au cas le plus général).

Il faut bien entendu opérer avec une sonde de capture (et une sonde de détection) suffisamment longue pour que la température de demi-dissociation soit supérieure à la température choisie. Si l'on veut réaliser un test très sensible (en particulier un test sensible à une seule mutation), il conviendra d'utiliser une sonde de capture (et/ou une sonde de détection) ajustée, c'est-à-dire de longueur suffisamment courte et de séquence telle que la température de demi-dissociation ne soit que très peu supérieure à la température d'hybridation prédéterminée, l'écart entre les deux températures étant par exemple de 1 à 3°C, car il convient de travailler alors à la température maximum admissible pour éviter des hybridations non-spécifiques qui seraient possibles en adoptant une température trop basse par rapport à la température de dissociation de l'hybride parfaitement complémentaire. En fait, l'écart de température admissible peut être déterminé dans chaque cas par de simples expériences de routine.

Dans le cas qui vient d'être indiqué, à la température d'hybridation fixée, seule une cible parfaitement homologue de la sonde de capture restera fixée sur la sonde, tandis qu'une cible comportant une mutation ponctuelle dans la région complémentaire de la sonde ne sera pas fixée.

Dans la discussion précédente, on a surtout mis l'accent sur le choix d'une sonde de capture qui est adaptée à la température d'hybridation choisie principalement par des ajustements de la taille

-12-

de la sonde. Mais il est bien évident pour les spécialistes qu'il est possible de jouer également sur le choix de la séquence de la sonde, puisque la température de demi-dissociation peut varier en fonction de la nature des bases impliquées dans la formation de l'hybride. Il est également possible de jouer sur les conditions d'hybridation, et en particulier sur la concentration saline de la solution d'incubation et/ou de la solution utilisée pour le lavage consécutif à l'incubation. On sait en effet que l'augmentation de la concentration saline entraîne une augmentation de la température de demi-dissociation.

Dans la mise en oeuvre pratique du procédé de l'invention, lorsqu'on utilise une sonde de capture et/ou des conditions d'hybridation adaptées à la température prédéterminée choisie, on pourra opérer de deux façons.

Selon un premier mode d'exécution, on effectue l'étape d'incubation à ladite température prédéterminée et on effectue le lavage à ladite température ou à une température inférieure. Ce mode d'exécution est rendu possible puisqu'à la température à laquelle on opère, seule une cible parfaitement homologue de la sonde de capture a pu s'hybrider, de sorte qu'il n'y a pas de risque de fixation d'une cible non parfaitement homologue, même si on effectue le lavage à une température inférieure à la température d'incubation.

Selon un second mode d'exécution, on effectue l'étape d'incubation à une température inférieure à ladite température prédéterminée et on effectue le lavage à ladite température prédéterminée. En effet, dans ce cas, c'est la température de lavage qui sera discriminante, et tout hybride éventuellement formé, à la température d'incubation, entre la sonde de capture et une cible non parfaitement homologue ne sera plus stable à la température de lavage et ne restera donc pas fixé sur le support.

Pour la détection d'une mutation ponctuelle, on peut opérer de deux façons :

- soit la sonde de capture contient la mutation complémentaire de la mutation recherchée, auquel cas seule la cible mutée s'hybridera dans les conditions du test d'hybridation ;

-13-

- soit la sonde de capture est parfaitement homologue de la séquence complémentaire de la cible non mutée, auquel cas seules les cibles non mutées s'hybrideront.

Le procédé de l'invention est applicable notamment :

- à la détection de l'ADN ou de l'ARN messager des virus, ou de l'ARN des rétrovirus ;

- à la détermination de l'ADN, de l'ARN messager ou ribosomal et des hybrides ADN_c-ARN des bactéries, des parasites et des levures ;

- et à la détermination de l'ADN des vertébrés, et en particulier chez l'homme pour effectuer le typage HLA ou pour détecter des maladies génétiques (myopathie, diabète, mucoviscidose, etc...).

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois la limiter.

Dans ces exemples, on a représenté les séquences nucléotiques, selon la convention usuelle, avec l'extrémité 5' à gauche.

L'invention a également pour objet l'utilisation des sondes décrites dans les exemples pour la détection de la cible indiquée. Il faut bien comprendre que les sondes mentionnées dans les exemples doivent être considérées comme des séquences minimum pouvant être allongées (dans les limites indiquées de 30, 25 ou 20 nucléotides au maximum) par adjonction de nucléotides supplémentaires qui sont bien entendu choisis pour que la sonde soit homologue de la cible dont la séquence est ici supposée connue. Les sondes mentionnées comme étant satisfaisantes dans les exemples permettent toutes d'opérer à 37°C.

Dans les exemples pour lesquels on donne deux séquences pour la sonde de capture (ou pour la sonde de détection), cela signifie que l'on peut utiliser l'une des sondes ou les deux sondes. L'utilisation de deux sondes de capture et/ou de deux sondes de détection permet d'augmenter le signal lorsque les résultats ne sont pas satisfaisants avec une seule sonde.

Les indications concernant les figures 1 et 2 annexées sont données respectivement aux exemples 10 et 15.

- 14 -

EXAMPLE 1

Préparation du phosphoramidite-bras pour l'addition d'un bras NH₂ en 5' d'un oligonucléotide.

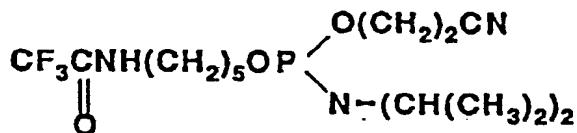
21,0 g (0,2 mole) d'amino-5 pentanol-1 (Aldrich 12304-8) sont dissous dans 90 ml de THF et l'on ajoute 5,3 g de Na_2CO_3 . Le mélange est refroidi à - 5 ° C et l'on additionne goutte à goutte 14 g (0,067 mole) d'anhydride trifluoroacétique (Aldrich 10623-2) dissous dans 50 ml de THF en 1 h.

Le mélange est laissé 1 h sous agitation à température ambiante. Après filtration et évaporation du THF, le produit est distillé sous vide. La fraction $E_{0,3}$ mm = 75-90° C est recueillie et purifiée sur gel de silice par un mélange CH_2Cl_2 , MeOH 80 : 20.

Le produit désiré à un Rf de 0.6. Le rendement est de 66 %.

0,7 g d'aminoalcool protégé ($3,48 \cdot 10^{-3}$ mole) sont séchés à la piridine (2 X 3 ml) avec 3 ml de N-éthyldiisopropylamine ($13,92 \cdot 10^{-3}$ mole) et dissous dans 15 ml de CH_2Cl_2 . 1,65 g ($6,96 \cdot 10^{-3}$ mole) de cyanoéthyl-2-N,N-diisopropylchlorophosphoramidite (Aldrich 30230-9) sont additionnés sous argon à température ambiante pendant 35 mn. On ajoute 0,2 ml de MeOH et après 10 mn sous agitation, 30 ml d'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée à froid avec 2 fois 60 ml de Na_2CO_3 10 % puis 2 X 80 ml de NaCl saturé, séchée sur Na_2SO_4 puis évaporée à l'évaporateur rotatif.

Le produit brut est purifié sur colonne de silice dans le mélange acétate d'éthyle-CH₂Cl₂-NEt₃ (45-45-10.) La fraction recueillie (*Rf* = 0,75) est concentrée à l'évaporateur rotatif et conservée sous argon.



EXEMPLE 2

Préparation d'un conjugué oligonucléotide ASB :

L'oligonucléotide est synthétisé sur un appareil automatique APPLIED 381A en utilisant la chimie des phosphoramidites. Le bras phosphoramidite, dissout dans de l'acétonitrile anhydre à une concentration de 0.2 Molaire, est placé en position X du synthétiseur et l'addition du bras se fait selon le protocole standard en fin de synthèse. Après déprotection une nuit à 55° C dans NH₄OH 33 %, précipitation dans l'éthanol à - 20 ° C, l'oligonucléotide est séché sous vide et repris dans 1 ml d'eau. 3.10⁻⁸ mole d'oligonucléotide sont séchés sous vide et repris dans 25 µl de tampon borate de sodium 0.1 M pH 9.3. On additionne 500 µl d'une solution à 30 mg/ml de DITC (Fluka 78480) dans le DMF. Le mélange est agité 1h 30 à

- 15 -

température ambiante avant l'addition de 3 ml d'H₂O. Après extraction de la solution par le butanol (3 x 3 ml), la phase aqueuse restante (500 µl) est séchée sous vide puis reprise par 1.10⁻⁷ mole (6,6 mg) de BSA (Pierce 30444) dans 200 µl de tampon borate. Après une nuit sous agitation à température ambiante le conjugué est purifié par échange d'ions en CLHP sur une colonne AX300 (BROWNLEE 4.6 X 100 mm) par un gradient de NaCl (Tableau 1). Le pic du conjugué est dialysé contre de l'eau (2 X 1 litre) concentré sous vide , repris par 1 ml H₂O et stocké à - 20° C.

TABLEAU 1

LONGUEUR	OLIGONUCLEOTIDE	Tr min	mM NaCl	Ratio oligo/ASB
20	5'-AACGCTACTACTATTAGTAG-3'	11,96 (2M)	603	1,0
15	5'-TTGCATTTAGAGCCC-3'	15,50 (1M)	395	1,4
13	5'-TGCATTTAGAGCC-3'	15,47 (1M)	385	1,1
12	5'-GCATTTAGAGCC-3'	14,49 (1M)	367	1,6
11	5'-GCATTTAGAGC-3'	14,41 (1M)	365	1,2
9	5'-CATTTAGAG-3'	13,99 (1M)	356	1,1

- Tr = temps de rétention en fonction de la concentration en NaCl
- Le gradient d'élution est de 10% à 56% de tampon B en 25 minutes avec

tampon A = 20 mM tampon phosphate de sodium, pH 7,00

tampon B = tampon A contenant 2M (ou 1M) NaCl

- 16 -

EXEMPLE 3

Préparation d'un conjugué oligonucléotide peroxydase de raifort.

Selon l'exemple 2, l'oligonucléotide activé séché sous vide est repris par 1.25×10^{-7} mole (5 mg de peroxydase de raifort (Boehringer 413470) dans 200 µl de tampon boraté.

Le protocole de purification est identique : le conjugué est stocké à - 20°C dans un tampon 50 mM tris HCl ph 7.0, 40 % glycérol

Les résultats sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2

TYPE	SEQUENCE 5'----> 3'	Tr min	mM NaCl	Ratio oligo/HRP
TEM	TGCCATAACCATGAGTG	22,26 (1M)	491	1,1
TEM	ATAACACTGCGGCCAAC	20,01 (1M)	450	1,0
TEM	GTTGGCCGCAGTGTAT	11,03 (2M)	569	1,5
TEM	CACTCATGGTTATGGCA	11,45 (2M)	585	1,3
B GLUCURONIDASE	GATGCCGGTGTCA GT TCTTT	11,85 (2M)	599	1,5
B GLUCURONIDASE	TTCCATGGGTTCTCACAGA	11,83 (2M)	600	1,1
B GLOBINE	GTATCATGCCCTTTCACC	11,57 (2M)	590	1,0
B GLOBINE	TTTCTGGGTTAAGGCAATAGC	11,82 (2M)	600	1,1
RAS	TTCCCTCTGTGTATTGCCAT	22,99 (1M)	505	1,0
RAS	ACATGAGGACAGGCGAAGGC	20,97 (1M)	467	1,1
C. TRACHOMATIS	AATCCTGGCTGAACCAAGCCT	20,70 (1M)	462	1,0
C. TRACHOMATIS	AAGGTTTCGGCGGAGATCCT	19,30 (1M)	437	1,0
HIV 1-2 GAG	GAAGCTGCAGAACATGGGA	9,18 (2M)	501	1,3
HIV 1 ENV	AACAATTTCGCTGAGGGCTAT	25,19 (1M)	545	1,0
HIV 2 ENV	GGTCAAGAGACAAAGAA	9,19 (2M)	501	1,4
HIV 1 POL	GCCTGTTGGTGGGC	9,56 (2M)	515	1,0
HLA DR	CCGGCGGTGAC(G/T)GAGCTGGGC	12,31 (2M)	616	1,3
HLA DR	GAACAGCCAGAAGGAC	9,84 (2M)	525	1,0
HLA DQ	GGGGCGCTGATGCCGAGTAC	10,16 (2M)	537	1,1
HPV 6/11	GACCTGTAGGGTTACATT	10,20 (2M)	539	1,0
HPV 6/11	TGACCTGTGCTGTGGA	9,91 (2M)	528	1,0
HPV 16	CCGGACAGAGCCCATTAC	11,33 (2M)	580	1,1
HPV 16	CTCTACGCTTCGGTTGTGC	11,65 (2M)	592	1,0
HPV 18	GTATTGCATTAGAGCCCCA	13,07 (2M)	644	1,1
HPV 18	TAAGGCAACATTGCAAGACA	11,16 (2M)	574	1,1
alpha HPV 18	ACCCCGAGATTACGTTATGT	10,80 (2M)	560	1,0

* Tr = temps de rétention (minutes) en fonction de la concentration saline (1M ou 2M)

* Les conditions de gradient sont identiques à celles décrites dans l'exemple 2

- 17 -

EXEMPLE 4

Préparation d'un conjugué oligonucléotide-phosphatase alcaline.

Selon l'exemple 2, l'oligonucléotide activé séché sous vide est repris par 5.7 10⁻⁸ mole (8.0 mg) de phosphatase alcaline (Boehringer 567752) dans le tampon du fabricant.

Le protocole de purification est identique (Tableau 3). Le conjugué est stocké à + 4° C dans un tampon Tris HCl 30 mM, 1M NaCl, 1 mM MgCl₂,

pH 8.0.

TABLEAU 3

TYPE ADN	OLIGONUCLEOTIDE	Tr min	mM NaCl	Ratio oligo/enzyme
HPV 18	5'-GTATTGCATTTAGAGCCCCA-3'	9,53 (2M)	550	1,6
HPV 18	5'-TAAGGCAACATTGCAAGACA-3'	13,04 (2M)	680	1,4
HPV 18/33	5'-GTCCAATGCCAGGTGGATGA-3'	10,10 (2M)	572	1,0

* Tr = temps de rétention (minutes) en fonction de la concentration saline

* Les conditions de gradient sont les mêmes que pour l'exemple 2

EXEMPLE 5

Détection d'une séquence d'acide nucléique par protocole sandwich.

Dans une plaque de microtitration en polystyrène (Nunc 439454) est déposée une solution

de l'oligonucléotide 5'-TCAGAGGAAGAAAACGATGA-3' à 1 ng/μl (0.15 μM) dans du PBS 3X (0.45 M NaCl 0.15 M phosphate de sodium pH 7.0). La plaque est incubée 2 h à 37° C.

Après 3 lavages par 300 μl de PBS Tween (0.15M NaCl, 0.05M phosphate de sodium, pH 7.0 , PBS Tween 20 (MERCK 822184)) 50 μl de la séquence (5'-AAGGTCAACCGGAATTCATTTGGGGCTCTAAATGCAATACAATGTCTTGCA ATGTTGCCTTA-3') à différentes concentrations de 100 pg/μl (5nM) à 0,01pg/μl (0.5 pM) dans du tampon PBS saumon (PBS3X + ADN de sperme de saumon 10 ug/ml (Sigma D9156)) sont ajoutés dans les puits suivis de 50 μl d'une solution du conjugué oligonucléotide-péroxydase à la concentration de 0.1 ng/μl (15nM) en oligonucléotide dans un tampon PBS cheval (PBS3X + 10 % sérum de cheval (BioMérieux 55842)).

La plaque est incubée 1 h à 37° C et lavée par 3 X 300 μl de PBS Tween 100 μl de substrat OPD (ortho-phenylenediamine Cambridge Medical Biotechnology ref/456) dans un tampon OPD (0,05 M acide citrique, 0.1 M Na₂HPO₄, pH 4,93) à la concentration de 4 mg/ml auquel on ajoute extemporanément H₂O₂ à 30 volumes au 1/1000 sont ajoutés par puits.

Après 20min de réaction l'activité enzymatique est bloquée par 100 μl d'H₂SO₄ 1N et la lecture est effectuée sur Axia Microreader (BioMérieux) à 492 nm.

Sensibilité (Tableau 4) :

- 18 -

Tableau 4

	cible (pg)							
	5000	1000	500	100	50	2	0,1	0
valeur D.O.	> 2,5	1,007	0,559	0,136	0,067	0,028	0,006	0,005

D.O. = densité optique.

La limite de détection est de 2 pg de cible soit 10^{-17} mole.

Le système est parfaitement spécifique puisque le puits contenant l'ADN de saumon, qui est sous forme simple brin, n'est pas détecté (puits à 0 pg/ μ l de cible).

EXEMPLE 6

Ainsi qu'il l'a été montré pour l'anémie falciforme ou pour les oncogènes (dans Human Genetic diseases, a practical approach, K.E. DAVIES ed, IRL press, 1986), les mutations ponctuelles, à des positions spécifiques sur un gène, sont responsables de maladies génétiques et peuvent être détectées par hybridation de l'ADN génomique avec des sondes nucléiques. Dans certaines conditions, un mésappariement d'une base peut déstabiliser un hybride ADN-oligonucléotide. Ainsi, WALLACE R.B. et coll. (Nucl. Acid. Res., 6, 3543, 1979) détecte une mutation am-3 (A-C pour le gène muté à la place de C-G pour le gène normal) sur le gène du bactériophage Φ X174 par un système d'hybridation directe par filtre.

Des travaux ultérieurs ont montré que les mutations n'étaient pas équivalentes du point de vue de la déstabilisation d'un hybride.

Ainsi, F. ABOUBELA et coll. (Nucl. Acid. Res., 13, 4811, 1985) trouvent que les mésappariements contenant une Guanine (GT-GG-GA) sont moins déstabilisants que les mésappariements contenant une Cytosine (CA-CC) ou un mésappariement entre 2 pyrimidines (TT-CC-TC).

S. IKUTA et coll. (Nucl. Acid. Res., 15, 797, 1987) montrent que les mésappariements GT, GA sont moins déstabilisants que AA, TT, CT, CA.

L'exemple décrit ici présente une méthode de détection d'un ADN parfaitement homologue par un protocole sandwich à 37° C. Les oligonucléotides de capture sont fixés passivement sur la plaque. Les 5 cibles choisies sont décrites dans le tableau 5.

TABLEAU 5

3-ATTCGTTGTAACGTTCTGTAACATAACGTAATCTGGGGTTTACTTTAAGGCCAACTGGAA-5' X

3-ATTCGTTGTAACGTTCTGTAACATAACGTAAGTCTGGGGTTTACTTTAAGGCCAACTGGAA-5' XGT

3-ATTCGTTGTAACGTTCTGTAACATAACGTAAAACTCGGGGTTTACTTTAAGGCCAACTGGAA-5' XAA

3-ATTCGTTGTAACGTTCTGTAACATAACGTAATCTGGGGTTTACTTTAAGGCCAACTGGAA-5' XTT

3-ATTCGTTGTAACGTTCTGTAACATAACGTAATCTGGGGTTTACTTTAAGGCCAACTGGAA-5' XAG

4 mutations différentes ont été introduites dans 4 séquences cibles qui

- 19 -

diffèrent de la séquence X par 1 seule mutation.

Les mutations sont situées dans la zone 32 à 35 de la cible. Les 4 mésappariements sont de type GT (XGT), AA (XAA), TT (XTT), et AG (XAG), et on retrouve 2 mésappariements GT et AG qui sont les moins déstabilisants pour un hybride.

La sonde de détection D1 5'-TAAGGCAACATTGCAAGACA-3' est complémentaire de la région 1-20 de la cible et est commune pour toutes les cibles. Elle est marquée à l'extrémité 5' avec la peroxydase selon l'exemple 3.

La spécificité du système est amenée par les oligonucléotides de capture (Tableau 6).

Tableau 6

	OLIGONUCLEOTIDE	Tm 1,00E-09 M °C	Tm 1,00E-08 M °C
capture C15	5'-TTGCATTTAGAGCCC-3'	59,4	63,8
capture C13	5'-TGCATTTAGAGCC-3'	49,2	54,2
capture C12	5'-GCATTTAGAGCC-3'	43,7	48,8
capture C11	5'-GCATTTAGAGC-3'	34,3	39,8
capture C9	5'-CATTTAGAG-3'	7,7	14,1

Le Tm est calculé dans les conditions d'hybridation, c'est à dire 600 mM en sel pour les 2 concentrations de cible 10^{-8} et 10^{-9} molaire.

Les 5 oligonucléotides possèdent en 5' un bras C_5NH_2 pour permettre le couplage covalent sur l'albumine de serum de boeuf (C15, C13, C12, C11, C9).

Sauf indications contraires, le protocole sandwich est identique à celui décrit dans l'exemple 5.

La cible est déposée à 10^{-9} mole/l soit 20 pg/ μ l (Tableau 7) ou 10^{-8} mole/l soit 200 pg/ μ l (Tableau 8).

Tableau 7

	CIBLE (1,00E-09 M)				
	X	XGT	XAA	XTT	XAG
C 15	2,390	0,667	0,061	0,137	0,234
C13	0,405	0,030	0,005	0,008	0,018
C12	0,271	0,015	0,003	0,005	0,007
C11	0,100	0,004	0,004	0,005	0,005
C9	0,005	0,004	0,005	0,005	0,005
valeur de D.O. à 492 nm					

Tableau 8

	CIBLE (1,00E-08 M)				
	X	XGT	XAA	XTT	XAG
C 15	> 2,5	> 2,5	0,211	0,973	1,328
C13	2,320	0,198	0,010	0,060	0,081
C12	1,500	0,095	0,005	0,028	0,032
C11	0,610	0,014	0,003	0,014	0,008
C9	0,002	0,004	0,003	0,007	0,003
valeur de D.O. à 492 nm					

- . 20 -

L'hybride formé avec la cible contenant un mésappariement de type GT est le moins déstabilisé donc le plus difficile à détecter. Le ratio signal X/signal XGT peut donc servir de référence pour mesurer les performances du système (Tableau 9) :

Tableau 9

	RATIO X/XGT	
	1,00E-08	1,00E-09
C 15	-	4
C13	12	14
C12	16	18
C11	44	25
C9	-	-

L'oligonucléotide de capture C12 permet de détecter un mésappariement quelconque sur la séquence d'acide nucléique en conservant pour tous les mésappariements un signal inférieur à 0,100 pour les 2 concentrations et un ratio X/XGT >10.

EXEMPLE 7

Méthode de détection d'un ADN parfaitement homologue à 37°C. Les oligonucléotides de capture sont couplés à l'ASB et fixés passivement sur la plaque.

Le protocole sandwich est identique à celui de l'exemple 5.

Les oligonucléotides de capture sont couplés à l'ASB selon l'exemple 2.

La sonde de détection est la même que pour l'exemple 6

Les résultats sont présentés dans les Tableaux 10,11 et 12.

Tableau 10

	CIBLE (1,00E-08 M)				
	X	XGT	XAA	XTT	XAG
C 15	> 2,5	> 2,5	0,330	1,445	2,139
C13	> 2,5	0,394	0,025	0,078	0,092
C12	2,319	0,241	0,016	0,044	0,056
C11	0,763	0,025	0,006	0,007	0,009
C9	0,010	0,007	0,005	0,007	0,006
valeur de D.O. à 492 nm					

Tableau 11

	CIBLE (1,00E-09 M)				
	X	XGT	XAA	XTT	XAG
C 15	2,421	1,154	0,080	0,200	0,364
C13	0,050	0,075	0,015	0,019	0,024
C12	0,423	0,043	0,007	0,010	0,013
C11	0,134	0,007	0,007	0,006	0,009
C9	0,006	0,006	0,007	0,005	0,009

- 21 -

Tableau 12

RATIO X/XGT		
	1,00E-08	1,00E-09
C 15	-	2
C13	> 6	7
C12	10	10
C11	31	19
C9	-	-

L'oligonucléotide de capture C11 couplé à l'ASB permet de détecter un mésappariement quelconque sur la séquence d'acide nucléique en conservant pour tous les mésappariements un signal inférieur à 0,100 aux 2 concentrations et un ratio X/XGT > 10.

EXEMPLE 8

Méthode de détection d'un ADN parfaitement homologue à différentes températures .

Le protocole de détection est le même que pour l'exemple 7.

L'oligonucléotide de capture C11 est couplé à l'ASB et fixé passivement sur la plaque. La concentration de la cible est constante et fixée à 10^{-9} molaire. La température d'hybridation est variable (Tableau 13).

Tableau 13

TEMPERATURE °C	X	XGT	X/XGT
22	0,155	0,007	22
30	0,313	0,024	13
37	0,229	0,009	25
45	0,321	0,013	25
50	0,052	0,010	5

EXEMPLE 9

Méthode de détection d'un ADN parfaitement homologue à différentes températures.

Le protocole de détection est le même que pour l'exemple 7.

L'oligonucléotide de capture C13 est fixé passivement sur la plaque directement. La concentration de la cible est constante et fixée à 10^{-8} molaire. La température d'hybridation est variable (Tableau 14).

Tableau 14

TEMPERATURE °C	X	XGT	X/XGT
22	> 2,5	0,343	>7
30	2,028	0,337	6
37	2,281	0,227	10
45	1,458	0,134	11
50	0,653	0,017	38

EXEMPLE 10

Détection spécifique de la séquence ADN ou ARN correspondant au gène de la β lactamase de E. coli (Tem).

- 22 -

Dans le cas où la séquence à détecter correspond à de l'ARN messager, celui-ci est obtenu soit à partir d'une purification spécifique d'ARN (MANIATIS et coll. dans Molecular Cloning, a laboratory Manual, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982), soit à partir d'une lyse directe des bactéries après addition de soude (0,2 M final) sur le culot bactérien. Le système de détection utilisé est complémentaire du brin ARN messager correspondant au gène Tem.

Ce système se compose de 2 oligonucléotides de capture. L'adsorption passive est effectuée à une concentration totale de 0,15 µM utilisé comme décrit dans l'exemple 5.

La détection est effectuée par l'utilisation de 2 oligonucléotides marqués par la peroxydase (à la concentration totale de 15 nM).

Les séquences des oligonucléotides utilisés sont les suivantes :

CAPTURE 1 = 5'-GCACTGCATAATTCTT-3'

CAPTURE 2 = 5'-TACTGTCATGCCATCC-3'

DETECTION 1= 5'-GTTGGCCGCAGTGTTAT-3'

DETECTION 2 = 5'-CACTCATGGTTATGGCA-3'

Détection sur ARN non amplifié, purifié (Tableau 15):

Tableau 15

ARN PURIFIÉ	Valeur D.O.
10 µg ARN spécifique	0,100
1 µg ARN spécifique	0,014
10 µg ARN non spécifique	0,006

Détection sur ARN de colonies non purifié (Tableau 16):

Tableau 16

NOMBRE DE COLONIES	valeur D.O.
1,00E+08 colonies spécifiques	0,150
1,00E+07 colonies spécifiques	0,045
1,00E+06 colonies spécifiques	0,004
1,00E+05 colonies spécifiques	0,001
1,00E+08 colonies non spécifiques	0,001

La limite de détection du système sur ARN, sans amplification, est de 1 µg d'ARN total purifié et de 10⁶ - 10⁷ colonies bactériennes.

Dans le cas où la séquence à détecter correspond à de l'ADN non amplifié (plasmide pBR 322, contenant le gène de la β lactamase).

Dans ce cas, la détection est effectuée directement sur l'ADN dénaturé après les conditions décrites précédemment.

Le système de détection utilisé est le suivant :

CAPTURE 1 = 5'-GGATGGCATGACAGTA-3'

CAPTURE 2 = 5'-AGAGAATTATGCAGTGC-3'

- 23 -

DETECTION 1 = 5'-TGCCATAACCATGAGTG-3'
DETECTION 2 = 5'-ATAACACTGCGGCCAAC-3'

Les résultats sont les suivants (Tableau 17) :

Tableau 17

ADN pBR322	valeur D.O.
1 ug	0,130
0,1 ug	0,012
0,01 ug	0,002
10 ug ADN saumon	0,002

La sensibilité sur ADN non amplifié est de 0,1 µg, c'est à dire $3,48 \cdot 10^{-14}$ mole correspondant à $2 \cdot 10^{10}$ molécules vraies.

Dans le cas où l'ADN à détecter correspond à de l'ADN amplifié par réaction en chaîne utilisant une polymérase, les oligonucléotides utilisés pour l'amplification sont les suivants :

AMORCE 1 = 5'-ATCAGCAATAACCAGC-3'
AMORCE 2 = 5'-CCCCGAAGAACGTTTC-3'

L'ADN à détecter est dénaturé par le protocole précédemment cité. La détection se fait en utilisant un des deux systèmes décrits dans cet exemple.

La figure 1 montre les résultats obtenus avec en abscisses la quantité d'ADN (ng) et en ordonnée la densité optique.

La sensibilité est de l'ordre de 1 ng d'ADN obtenu après amplification en considérant que la quantité d'ADN total générée après amplification est de l'ordre de 2,0 µg.

Pour un fragment amplifié de 560 paires de bases, le seuil de détection est donc de l'ordre de $2,94 \cdot 10^{-15}$ mole soit $1,7 \cdot 10^9$ molécules vraies.

EXAMPLE 11

Détection de la séquence correspondant au gène E7 du papillomavirus humain type 6.

Dans le cas où la séquence à détecter est de l'ADN amplifié, les séquences utilisées sont les suivantes :

AMORCE 1 = 5'-TACACTGCTGGACAAACATGC-3'

AMORCE 2 = 5'-GTGCGCAGATGGGACACAC-3'

L'ADN amplifié ou non peut être détecté par le système suivant (déttection brin -)

CAPTURE 1 = 5'-CAGTGTACAGAAACA-3'

CAPTURE 2 = 5'-GAGTGCACAGACCGGA-3'

DETECTION 1= 5'-GACCCTGTAGGGTTACATT-3'

DETECTION 2 = 5'-TGACCTGTTGCTGTGGA-3'

EXAMPLE 12

Détection de la séquence ADN correspondant au gène E7 du papillomavirus humain type 11.

Dans le cas où la séquence à détecter est de l'ADN amplifié, les séquences utilisées sont les suivantes :

AMORCE 1 = 5'-TACACTGCTGGACAAACATGC-3'

- 25 -

AMORCE 2 = 5'-GTGCGCAGATGGGACACAC-3'

L'ADN amplifié ou non peut être détecté par le système suivant (Détection brin -).

CAPTURE 1 = 5'-GAGTGCACAGACGGGA-3'

CAPTURE 2 = 5'-CAACTACAAGACCTTTGC-3'

DETECTION 1 = 5'-GACCCTGTAGGGTTACATT-3'

DETECTION 2 = 5'-TGACCTGTTGCTGTGGA-3'

EXEMPLE 13

Détection de la séquence ADN correspondant aux gènes E7 des papillomavirus humains type 6 et 11.

Dans le cas où la séquence à détecter est de l'ADN amplifié, les séquences utilisées sont les suivantes :

AMORCE 1 = 5'-TACACTGCTGGACAACATGC-3'

AMORCE 2 = 5'-GTGCGCAGATGGGACACAC-3'

L'ADN amplifié ou non peut être détecté par le système suivant (Détection brin -).

CAPTURE 1 = 5'-AGACAGCTCAGAAGATGAGG-3'

CAPTURE 2 = 5'-CAGCAACGT(T/C)CGACTGGTTG-3'

DETECTION 1 = 5'-GACCCTGTAGGGTTACATT-3'

DETECTION 2 = 5'-TGACCTGTTGCTGTGGA-3'

EXEMPLE 14

Détection de la séquence ADN correspondant au gène E7 du papillomavirus humain type 16.

Dans le cas où la séquence à détecter est de l'ADN amplifié, les séquences utilisées sont les suivantes :

AMORCE 1 = 5'-CCCAGCTGTAATCATGCATGGAGA-3'

AMORCE 2 = 5'-GTGTGCCCATTAACAGGTCTCCA-3'

L'ADN amplifié ou non peut être détecté par le système suivant (Détection brin -).

CAPTURE 1 = 5'-TATATGTTAGATTTGCAACC-3'

CAPTURE 2 = 5'-GACAACTGATCTCTAC-3'

DETECTION 1 = 5'-CCGGACAGAGCCCATTAC-3'

- 26 -

DETECTION 2 = 5'-CTCTACGCTTCGGTTGTGC-3'

EXEMPLE 15

Détection de la séquence ADN correspondant au gène E7 du papillomavirus humain type 18.

Dans le cas où la séquence à détecter est de l'ADN amplifié, les séquences utilisées sont les suivantes :

AMORCE 1 = 5'-CGACAGGAACGACTCCAACG-3'

AMORCE 2 = 5'-GCTGGTAAATGTTGATGATTAAC-3'

L'ADN amplifié ou non peut être détecté par le système suivant (Détection brin -).

CAPTURE 1 = 5'-TCAGAGGAAGAAAACGATGA-3'

CAPTURE 2 = 5'-ATGTCACGAGCAATTAGCG-3'

DETECTION 1= 5'-GTATTGCATTTAGAGCCCCA-3'

DETECTION 2 = 5'-TAAGGCAACATTGCAAGACA-3'

L'ADN à détecter est dénaturé par le protocole précédemment cité.

La figure 2 représente les résultats obtenus, avec en abscisses la quantité d'ADN, et en ordonnées la densité optique (on voit sur la figure 2 que seul l'HPV18 est détecté), l'HPV 16 ne l'est pas.

La sensibilité est de l'ordre de 1 ng d'ADN.

EXEMPLE 16

Système de détection de papillomavirus humain de type 6, 11, 16 et 18.

L'exemple décrit la détection de chaque type après une amplification non spécifique, par réaction en chaîne utilisant une polymérase.

Celle-ci est effectuée avec un mélange de tous les oligonucléotides décrits dans les exemples 11, 12, 13, 14 et 15.

Chaque oligonucléotide est utilisé à une concentration de 0,3 µM.

La capture se fait en utilisant l'ensemble des oligonucléotides de capture décrits dans les exemples 11, 12, 13, 14 et 15 (adsorption passive, protocole décrit exemple 5).

La détection se fait spécifiquement en utilisant l'un des couples d'oligonucléotides marqués à la peroxydase décrit dans les exemples 11, 12, 13, 14 et 15.

Les résultats et spécificité obtenus sont les suivants sans le cas où la détection est effectuée sur le 1/100^e du produit de l'amplification.

(Tableau 18)

Tableau 18

SYSTEME DE DETECTION

ADN AMPLIFIE	HPV18	HPV16	HPV6/11
HPV6	0,001	0,004	1,100
HPV16	0,002	0,840	0,008
HPV18	0,600	0,028	0,002
HPV6+16	0,001	0,845	0,480
HPV6+16+18	0,540	0,821	0,320
HPV6+18	0,580	0,020	0,687
HPV16+18	0,516	0,740	0,007
HPV2 non spécifique	0,001	0,018	0,002
Eau : témoin non spécifique	0,001	0,014	0,001

EXEMPLE 17

Détection de la séquence ADN correspondant au gène de la protéine majeure de la membrane externe (MOMP) de Chlamydia Trachomatis.

Dans le cas où la séquence à détecter est de l'ADN amplifié, les séquences utilisées sont les suivantes :

AMORCE D'AMPLIFICATION 1 = 5'-CACCATAGTAACCCATACGC-3'

AMORCE D'AMPLIFICATION 2 = 5'-GCCGCTTGAGTTCTGCTTCC-3'

L'ADN amplifié ou non peut être détecté par le système suivant (détection

brin -).

CAPTURE 1 = 5'-GCCGCTTGAGTTCTGCTTCC-3'
CAPTURE 2 = 5'-CTTGCAAGCTCTGCCTGTGG-3'

DETECTION 1 = 5'-AATCCTGGCTGAACCAAGCCT-3'
DETECTION 2 = 5'-AAGGTTCGGCGGAGATCCT-3'

EXEMPLE 18

Détection de la séquence ADN correspondant à la région gag du rétrovirus HIV 1.

Dans le cas où la séquence à détecter est de l'ADN amplifié, les séquences utilisées sont les suivantes :

AMORCE 1 = 5'-GGACATCAAGCAGCCATGC-3'
AMORCE 2 = 5'-CTAGTAGTTCTGCTATGTC-3'

L'ADN amplifié ou non peut être détecté par le système suivant

CAPTURE 1 = 5'-AATGTTAAAAGAGAC-3'

DETECTION 1 = 5'-GAAGCTGCAGAATGGGA-3'

EXEMPLE 19

Détection de la séquence ADN correspondant à la région gag du rétrovirus HIV 2.

Dans le cas où la séquence à détecter est de l'ADN amplifié, les séquences utilisées sont les suivantes :

AMORCE 1 = 5'-GACCATCAAGCAGCCATGC-3'
AMORCE 2 = 5'-CTTGTGTCCTGCTATGTC-3'

L'ADN amplifié ou non peut être détecté par le système suivant

CAPTURE 1 = 5'-CTTACCAAGCGGGGCAGC-3'

DETECTION 1 = 5'-GAAGCTGCAGAATGGGA-3'

EXEMPLE 20

Détection de la séquence ADN correspondant à la région env du rétrovirus HIV 1.

Dans le cas où la séquence à détecter est de l'ADN amplifié, les séquences utilisées sont les suivantes :

AMORCE 1 = 5'-CAGGAAGCACTATGGGCGC-3'

- 29 -

AMORCE 2 = 5'-GCTGCTTGATGCCAGAC-3'

L'ADN amplifié ou non peut être détecté par le système suivant

CAPTURE 1 = 5'-TGTCTGGTATAGTGCA-3'

DETECTION 1= 5'-AACAAATTGCTGAGGGCTAT-3'

EXEMPLE 21

Détection de la séquence ADN correspondant à la région env du rétrovirus HIV 2.

Dans le cas où la séquence à détecter est de l'ADN amplifié, les séquences utilisées sont les suivantes :

AMORCE 1 = 5'-CAGGCAGTTCTGCAATGGG-3'

AMORCE 2 = 5'-GGTTTTCGTCCCCAGACG-3'

L'ADN amplifié ou non peut être détecté par le système suivant

CAPTURE 1 = 5'-GCAACAGCAACAGCTGTTGGA-3'

DETECTION 1= 5'-GGTCAAGAGACAACAAGAA-3'

EXEMPLE 22

Détection de la séquence ADN correspondant à la région pol du rétrovirus HIV 1.

Dans le cas où la séquence à détecter est de l'ADN amplifié, les séquences utilisées sont les suivantes :

AMORCE 1 = 5'-ATTAGCAGGAAGATGGCCAG-3'

AMORCE 2 = 5'-CTGCCATTGTACTGCTGGTC-3'

L'ADN amplifié ou non peut être détecté par le système suivant

CAPTURE 1 = 5'-GACAATGGCAGCAATTTCACC-3'

DETECTION 1= 5'-GCCTGTTGGTGGGC-3'

EXEMPLE 23

Détection de la séquence ADN correspondant au gène de la région β glucuronidase de E coli.

Dans le cas où la séquence à détecter est de l'ADN amplifié, les séquences utilisées sont les suivantes :

AMORCE 1 = 5'-CAATACGCTCGAACGACGT-3'

AMORCE 2 = 5'-CACGGGTTGGGGTTCTAC-3'

- 30 -

L'ADN amplifié ou non peut être détecté par le système suivant (déttection brin -)

CAPTURE 1 = 5'-TGGCTTCTGTCAACGCTGTT-3'

CAPTURE 2 = 5'-ATGCGATCTATCACGCTG-3'

DETECTION 1 = 5'-GATCGCGGTGTCAGTTCTT-3'

DETECTION 2 = 5'-TTCCATGGGTTCTCACAGA-3'

EXEMPLE 24

Détection de la séquence ADN correspondant au gène de la région β globine humaine.

Dans le cas où la séquence à détecter est de l'ADN amplifié, les séquences utilisées sont les suivantes :

AMORCE 1 = 5'-GAATCAGAATAATCCAGCCT-3'

AMORCE 2 = 5'-TGTTTACGCAGTCTGCCTAG-3'

L'ADN amplifié ou non peut être détecté par le système suivant (déttection brin -)

CAPTURE 1 = 5'-TGTTTACGCAGTCTGCCTAG-3'

CAPTURE 2 = 5'-CACATATTGACCAAATCAGG-3'

DETECTION 1 = 5'-GTATCATGCCTCTTGCACC-3'

DETECTION 2 = 5'-TTTCTGGGTTAAGGCAATAGC-3'

EXEMPLE 25

Détection de la séquence ADN correspondant à l'oncogène ras

Dans le cas où la séquence à détecter est de l'ADN amplifié, les séquences utilisées sont les suivantes :

AMORCE 1 = 5'-TGTTATGATGGTGAAACCTG-3'

AMORCE 2 = 5'-CTGTAGAGGTAAATCCGAAA-3'

L'ADN amplifié ou non peut être détecté par le système suivant (déttection brin -).

CAPTURE 1 = 5'-CAGTGCCATGAGAGACCAAT-3'

CAPTURE 2 = 5'-CGACGCAGCCATGGTCGATGC -3'

- 31 -

DETECTION 1 = 5'-TTCCTCTGTGTATTGCCAT-3'
 DETECTION 2 = 5'-ACATGAGGACAGGCGAAGGC-3'

EXEMPLE 26

Utilisation d'alpha oligonucléotide marqué à la peroxydase en détection.

Protocole selon l'exemple 5.

Cible :

5'-TCATCGTTTCTCCTCTGAGTCGCTTAATTGCTCGTACATAGAAGGTCAACCG
 GAATTTCATTTGGGGCTCAAATGCAATACAATGTCTTGCAATG TTGCCTTA -3'

Capture : 5'-TCAGAGGAAGAAAACGATGA-3'

La sonde de détection utilisée est l'alpha oligonucléotide 5'-ACCCCGAGATT
 TAGGTTATGT-3' greffé à la peroxydase de raifort selon l'exemple 3.

La limite de détection est de 5 pg de cible soit $5 \cdot 10^{-17}$ mole (Tableau 19).

Tableau 19

	cible (pg)					
	5000	500	50	5	0,5	0
valeur D.O.	> 2,5	0,622	0,073	0,025	0,008	0,007

EXEMPLE 27

Phosphatase alcaline comme enzyme de détection en colorimétrie.

Protocole selon l'exemple 5 :

La sonde de détection 5'-TAAGGCAACATTGCAAGACA-3' est couplée à la phosphatase alcaline selon l'exemple 4.

100 µl de substrat PNPP (Sigma 104-0) à la concentration de 2 mg/ml (dans un tampon diéthanolamine 1,29 M; MgSO₄ 0,56 mM; NaN₃ 0,38 mM; HCl 0,012 N; pH 9,8) sont ajoutés par puits. Après 20 mn de réaction, l'activité enzymatique est bloquée par 100 µl de NaOH 1 N et la lecture est effectuée sur Axamicroreader (BioMérieux) à 402 nm.

Capture : 5'-TCAGAGGAAGAAAACGATGA-3'

Cible : plasmide pBR322 contenant le gène du PVH de type 18 à 20 µg/ml

Tableau 20

	dilution de la cible					
	100	500	1000	2000	5000	blanc
valeur D.O.	0,505	0,086	0,054	0,029	0,008	0,008

La limite de détection est le 1/2000 de la cible (Tableau 20), c'est à dire de l'ordre de 500 pg soit $1.8 \cdot 10^{-16}$ mole.

- 32 -

EXEMPLE 28

Phosphatase alcaline comme enzyme de détection en fluorescence. Le protocole est le même que pour l'exemple 27 mais l'on rajoute comme substrat 100 µl de méthyl-4 umbelliferyl phosphate (MUP, Boehringer ref. 405663) dans un tampon glycine-NaOH 100 mM, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 0.1 mM, NaN₃ 0.5 g/l, pH 10.3 , à la concentration de 80 µg/ml.

La réaction est bloquée après 20 minutes par 100 µl de KH₂PO₄ 0,5M, pH 10,4, 10 mM EDTA et lue au fluorimètre (excitation 340 nm, émission 460 nm) (Tableau 21)

Tableau 21

	dilution de la cible					
	100	500	1000	2000	5000	blanc
unités fluorescence	643	167	94	82	66	47

EXEMPLE 29

Détection du virus HIV 1

a) Région NEF

Pour l'amplification, on utilise les séquences suivantes

AMORCE 1	5'-CATTGGTCTTAAAGGTACCTG-3'
AMORCE 2	5'-AAGATGGGTGGCAITGGTC-3'

Les sondes de capture et de détection sont les suivantes :

CAPTURE	5'-GAGGAGGTIGGTTTCCAGTCA-3'
DETECTION	5'-GGATGGCCTICTITAAGGGAAAGAATG-3'

b) Région VPR

Pour l'amplification, on utilise les séquences suivantes :

AMORCE 1	5'-TGGAACAAGCCCCAGIAGACC-3'
AMORCE 2	5'-TGCTATGTIGACACCCAATTCTG-3'

- 33 -

Les sondes de capture et de détection sont les suivantes :

CAPTURE	5'-TATGAAACTTATGGGGATAC-3'
DETECTION	5'-GAAGCTGTTAGACATTTCCTAG-3'

c) Région POL

Les sondes de capture et de détection sont les suivantes :

CAPTURE	5'-TGAACAAAGTAGATAAATTAG-3'
DETECTION	5'-GGAATCAGIAAAGTACTATT-3'

REVENDICATIONS

1. Procédé de détection d'une séquence nucléotidique simple brin dans un échantillon la contenant ou susceptible de la contenir, selon la technique d'hybridation sandwich comportant une étape d'incubation de l'échantillon avec une sonde de capture fixée de façon passive sur un support solide et une sonde de détection marquée avec un marqueur non radioactif, les sondes de capture et de détection étant capables d'hybridation, respectivement, avec deux régions non chevauchantes de la séquence nucléotidique-cible recherchée, et l'étape d'incubation étant suivie d'une étape de lavage pour éliminer les réactifs non fixés par hybridation, caractérisé par le fait que la sonde de capture, contenant de 9 à 30 nucléotides, est fixée de façon passive sur un support solide en matériau hydrophobe.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que ledit matériau hydrophobe est un polymère hydrophobe.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé par le fait que ledit polymère est un polymère ou copolymère de styrène.

4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que la sonde de capture contient de 9 à 25, et en particulier de 9 à 20 nucléotides.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que l'on opère à une température pré-déterminée, et que l'on choisit des sondes de capture et de détection de taille suffisamment longue et de séquence telle que l'hybride que chaque sonde forme avec la cible recherchée soit stable à ladite température, dans les conditions d'hybridation utilisées.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé par le fait que la sonde de capture et/ou la sonde de détection est suffisamment courte et de séquence telle que seule la présence d'une séquence complémentaire parfaitement homologue dans la cible permette de former avec ladite sonde suffisamment courte un hybride stable à ladite température dans les conditions d'hybridation utilisées.

7. Procédé selon la revendication 5 ou 6, caractérisé par le fait que l'on effectue l'étape d'incubation à ladite température

prédéterminée et que l'on effectue le lavage à ladite température ou à une température inférieure.

8. Procédé selon la revendication 5 ou 6, caractérisé par le fait que l'on effectue l'étape d'incubation à une température inférieure à ladite température prédéterminée, et que l'on effectue le lavage à ladite température prédéterminée.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 8, caractérisé par le fait que ladite température prédéterminée, est comprise entre 20 et 60°C, notamment entre 25 et 40°C, et est en particulier égale à 37°C.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que la sonde de détection contient au moins 9 nucléotides.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé par le fait que la sonde de détection contient au moins 15 nucléotides.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que l'hybride formé par la sonde de capture et la cible recherchée est moins stable que l'hybride formé par ladite cible avec la sonde de détection.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que la sonde de détection est plus longue, en nombre de nucléotides, que la sonde de capture.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que la sonde de capture et/ou la sonde de détection contient ou est constituée par des alpha-D-nucléotides.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que ladite sonde de capture contient au moins onze nucléotides et est fixée de façon passive directement sur le support solide.

16. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé par le fait que la sonde de capture est fixée sur le support par l'intermédiaire d'une protéine à laquelle elle est liée de façon covalente.

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé par le fait que ladite protéine est une albumine de mammifère ou une toxine protéique bactérienne.

- 36 -

18. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que le support est sous forme de tube, de bille, de particules ou de cône de pipettage, ou sous forme de plaque de microtitration.

19. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que l'on opère selon la technique d'hybridation sandwich simultanée.

20. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que la sonde de capture est soit une séquence parfaitement homologue de la séquence complémentaire de la cible, soit une séquence contenant une mutation ponctuelle par rapport à la séquence complémentaire de la cible.

21. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que la cible est la séquence d'ADN du papillomavirus humain HPV 18 et que la sonde de capture contient la séquence

TCAGAGGAAGAAAACGATGA

22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé par le fait que la sonde de détection contient la séquence :

TAAGGCCAACATTGCCAGACA

23. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisé par le fait que la cible est une séquence ARN messager correspondant au gène de la bêta-lactamase de E. Coli (Tem) et que la sonde de capture contient la séquence suivante :

5'-GCACTGCATAATTCTT-3'
et/ou 5'-TACTGTCATGCCATCC-3'

24. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que la sonde de détection contient la séquence suivante :

5'-GTTGGCCGCAGTGTAT-3'
et/ou 5'-CACTCATGGTTATGGCA-3'

25. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisé par le fait que la cible est une séquence d'ADN contenant le gène de la bêta-lactamase de E. coli et que la sonde de capture contient la séquence suivante :

5'-GGATGGCATGACAGTA-3'
et/ou 5'-AGAGAATTATGCAGTGC-3'

- 37 -

26. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que la sonde de détection contient la séquence suivante :

5'-TGCCATAACCATGAGTG-3'
et/ou 5'-ATAACACTGCGGCCAAC-3'

27. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisé par le fait que la cible est la séquence ADN correspondant au gène E7 du papillomavirus humain type 6 et que la sonde de capture contient la séquence suivante :

5'-CAGTGTACAGAAACA-3'
et/ou 5'-GAGTGCACAGACGGGA-3'

28. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que la sonde de détection contient la séquence suivante :

5'-GACCCTGTAGGGTTACATT-3'
et/ou 5'-TGACCTGTTGCTGTGGA-3'

29. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisé par le fait que la cible est la séquence ADN correspondant au gène E7 du papillomavirus humain type 11 et que la sonde de capture contient la séquence suivante :

5'-GAGTGCACAGACGGGA-3'
et/ou 5'-CAACTACAAGACCTTTGC-3'

30. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que la sonde de détection contient la séquence suivante :

5'-GACCCTGTAGGGTTACATT-3'
et/ou 5'-TGACCTGTTGCTGTGGA-3'

31. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisé par le fait que la cible est la séquence ADN correspondant aux gènes E7 des papillomavirus humains types 6 ou 11, et que la sonde de capture contient la séquence suivante :

5'-AGACAGCTCAGAAGATGAGG-3'
et/ou 5'-CAGCAACGT(T/C)CGACTGGTTG-3'

- 38 -

32. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que la sonde de détection contient la séquence suivante :

5'-GACCCTGTAGGGTTACATT-3'
et/ou 5'-TGACCTGTTGCTGTGGA-3'

33. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisé par le fait que la cible est la séquence ADN correspondant au gène E7 du papillomavirus humain type 16 et que la sonde de capture contient la séquence suivante :

5'-TATATGTTAGATTTGCAACC-3'
et/ou 5'-GACAAC TGATCTCTAC-3'

34. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que la sonde de détection contient la séquence suivante :

5'-CTCTACGCTTCGGTTGTGC-3'
et/ou 5'-CCGGACAGAGCCCCATTAC-3'

35. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisé par le fait que la cible est la séquence ADN correspondant au gène E7 du papillomavirus humain type 18 et que la sonde de capture contient la séquence suivante :

5'-TCAGAGGAAGAAAACGATGA-3'
et/ou 5'-ATGTCACGAGCAATTAAAGCG-3'

36. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que la sonde de détection contient la séquence suivante :

5'-GTATTGCATTTAGAGCCCCA-3'
et/ou 5'-TAAGGCAACATTGCAAGACA-3'

37. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisé par le fait que la cible est la séquence ADN correspondant au papillomavirus humain de type 18 et que la sonde de capture contient la séquence suivante :

5'-TCAGAGGAAGAAAACGATGA-3'

- 39 -

38. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que la sonde de détection contient la séquence suivante :

5'-TAAGGCAACATTGCAAGACA-3'

39. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisé par le fait que la cible est la séquence ADN correspondant au gène de la protéine majeure de la membrane externe (MOMP) de Chlamydia trachomatis et que la sonde de capture contient la séquence suivante :

5'-GCCGCTTGAGTTCTGCTTCC-3'
et/ou 5'-CTTGCAAGCTCTGCCTGTGG-3'

40. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que la sonde de détection contient la séquence suivante :

5'-AATCCTGGCTGAACCAAGCCT-3'
et/ou 5'-AAGGTTTCGGCGGAGATCCT-3'

41. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisé par le fait que la cible est une séquence correspondant, sous forme d'ADN, à la région gag du rétrovirus HIV1 et que la sonde de capture contient la séquence suivante :

5'-AATGTTAAAAGAGAC-3'

42. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que la sonde de détection contient la séquence suivante :

5'-GAAGCTGCAGAATGGGA-3'

43. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisé par le fait que la cible est une séquence correspondant, sous forme d'ADN, à la région gag du rétrovirus HIV2 et que la sonde de capture contient la séquence suivante :

5'-CTTACCAGCGGGGCAGC-3'

- 40 -

44. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que la sonde de détection contient la séquence suivante :

5'-GAAGCTGCAGAATGGGA-3'

45. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisé par le fait que la cible est une séquence correspondant, sous forme d'ADN, à la région env du rétrovirus HIV1 et que la sonde de capture contient la séquence suivante :

5'-TGTCTGGTATAGTGCA-3'

46. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que la sonde de détection contient la séquence suivante :

5'-AACAAATTGCTGAGGGCTAT-3'

47. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisé par le fait que la cible est une séquence correspondant, sous forme d'ADN, à la région env du rétrovirus HIV2 et que la sonde de capture contient la séquence suivante :

5'-GCAACAGCAACAGCTGTTGGA-3'

48. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que la sonde de détection contient la séquence suivante :

5'-GGTCAAGAGACAACAAGAA-3'

49. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisé par le fait que la cible est une séquence correspondant, sous forme d'ADN, à la région pol du rétrovirus HIV1 et que la sonde de capture contient la séquence suivante :

5'-GACAATGGCAGCAATTCACC-3'

50. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que la sonde de détection contient la séquence suivante :

5'-GCCTGTTGGTGGGC-3'

- 41 -

51. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisé par le fait que la cible est la séquence ADN correspondant au gène de la région bêta-glucuronidase de E. Coli. et que la sonde de capture contient la séquence suivante :

5'-TGGCTTCTGTCAACGCTGTT-3'
et/ou 5'-ATGCGATCTATATCACGCTG-3'

52. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que la sonde de détection contient la séquence suivante :

5'-GATCGCGGTGTCAGTTCTT-3'
et/ou 5'-TTCCATGGGTTCTCACAGA-3'

53. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisé par le fait que la cible est la séquence ADN correspondant au gène de la région bêta-globine humaine et que la sonde de capture contient la séquence suivante :

5'-TGTTTACGCAGTCTGCCTAG-3'
et/ou 5'-CACATATTGACCAAATCAGG-3'

54. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que la sonde de détection contient la séquence suivante :

5'-GTATCATGCCTCTTGCACC-3'
et/ou 5'-TTTCTGGGTTAAGGCAATAGC-3'

55. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisé par le fait que la cible est la séquence ADN correspondant à l'oncogène ras et que la sonde de capture contient la séquence suivante :

5'-CAGTGCATGAGAGACCAAT-3'
et/ou 5'-CGACGCAGCCATGGTCGATGC -3'

56. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que la sonde de détection contient la séquence suivante :

5'-TTCCTCTGTGTATTGCCAT-3'
et/ou 5'-ACATGAGGACAGGCGAAGGC-3'

- 42 -

57. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisé par le fait que la cible est la séquence ADN de HPV type 18 et que la sonde de capture contient la séquence suivante :

5'-TCAGAGGAAGAAAACGATGA-3'

58. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que la sonde de détection contient la séquence (alpha-nucléotidique) suivante :

alpha oligonucléotide 5'-ACCCCGAGATT

59. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisé par le fait que la cible est une séquence correspondant à la région NEF du rétrovirus HIV1, et que la sonde de capture contient la séquence :

5'-GAGGAGGTIGGTTTCCAGTCA-3'

60. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que la sonde de détection contient la séquence :

5'-GGATGGCCTCTTAAGGGAAAGAATG-3'

61. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisé par le fait que la cible est une séquence correspondant à la région VPR du rétrovirus HIV1, et que la sonde de capture contient la séquence :

5'-TATGAAACTTATGGGGATAC-3'

62. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que la sonde de détection contient la séquence :

5'-GAAGCTGTTAGACATTTCTAG-3'

- 43 -

63. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisé par le fait que la cible est une séquence correspondant à la région POL du rétrovirus HIV1, et que la sonde de capture contient la séquence :

5'-TGAACAAAGTAGATAAATTAG-3'

64. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que la sonde de détection contient la séquence :

5'-GGAATCAGIAAGTACTATT-3'

1/1
FIGURE 1

DETECTION ADN Tem APRES AMPLIFICATION

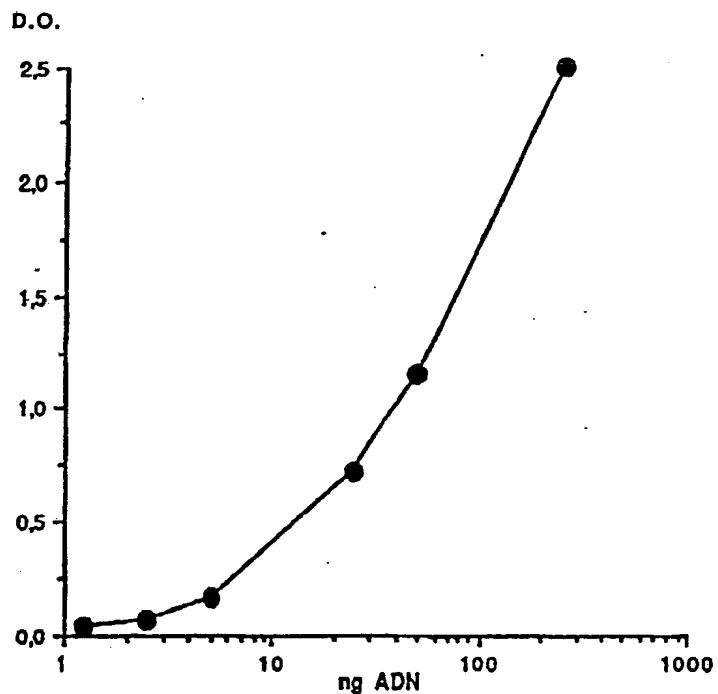
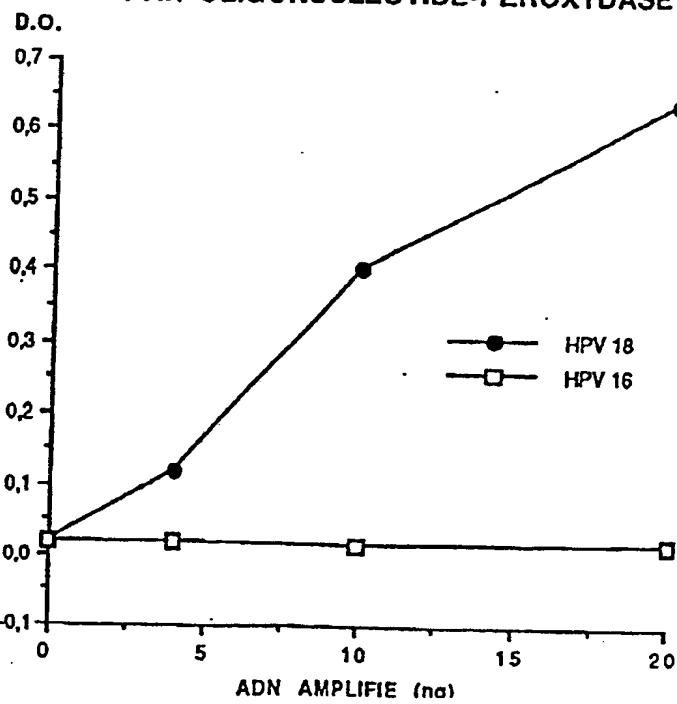


FIGURE 2
DETECTION ADN AMPLIFIE (HPV18)
PAR OLIGONUCLEOTIDE-PEROXYDASE



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 91/00468

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) *

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.Cl. ⁵ C 12 Q 1/68

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched ?

Classification System 1	Classification Symbols
Int.Cl. ⁵	C 12 Q

Documentation Searched other than Minimum Documentation
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched #

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT*

Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X	WO, A, 8801302 (SISKA DIAGNOSTICS INC.) 25 February 1988, see page 3, line 18 - page 4, line 8; page 5, lines 29-34; page 11, line 32 - page 13, line 11; page 22, lines 23-37; page 35, line 1 - page 37, line 22	1, 4-11, 16-20
A	WO, A, 8607387 (AMGEN) 18 December 1986, see page 8, line 5 - page 9, line 9; page 14, lines 22-25; page 21, lines 7-21; page 22, lines 29-33, page 35, line 14 - page 36, line 22	1-3
A	EP, A, 0202758 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES) 26 November 1986, see column 1, line 38 - column 4, line 15	20
		.../...

* Special categories of cited documents: 10

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search

24 September 1991 (24.09.91)

Date of Mailing of this International Search Report

14 October 1991 (14.10.91)

International Searching Authority

Signature of Authorized Officer

EUROPEAN PATENT OFFICE

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
A	EP, A, 0269764 (MOLECULAR BIOSYSTEMS, INC.) 8 June 1988, see page 7, line 21 - page 8, line 33; page 11, lines 25-42	1-3,13
A	WO, A, 9001069 (SEGEN DIAGNOSTICS, INC.) 8 February 1990, see page 35, line 10 - page 37, line 14	1,13,16-18
A	WO, A, 8804301 (C.N.R.S.) 16 June 1988, see age 18, line 15 - page 19, line 4 (cited in the application)	12
A	Clinical Chemistry, volume 31, No 9, 1985, R. Polsky-Cynkin et al.: "Use of DNA immobilized on plastic and agarose supports to detect DNA by sandwich hybridization", pages 1438-1443, see the article on the whole; in particular the abstract; page 1439, see column 1, line 55 - column 2, line 14; figure 2 (cited in the application)	1,13-19
A	Clinical Chemistry, volume 32, No 9, 1986, P. Helsingius et al.: "Solid-phase immunoassay of digoxin by measuring time-resolved fluorescence" pages 1767-1769, see page 1767, column 1, line 40 - page 1768, column 1, line 21	14-19
P,X	EP, A, 0405592 (SANYO CHEMICAL IND.) 2 January 1991, see column 10, line 50 - column 11, line 8; column 12, lines 10-20; column 13, line 40 - column 14, line 10; column 17, line 45 - column 18, line 5; column 20, lines 15-37	1-4
P,X	EPL, A, 0420260 (F. HOFFMAN-LA ROCHE) 3 April 1991, see page 4, lines 7-12; page 5, lines 15-36; page 6, lines 25-50; page 13, lines 30 - page 14, line 10	1-4

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9100468

SA 48526

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 08/10/91. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A- 8801302	25-02-88	EP-A-	0276302	03-08-88
		JP-T-	1500461	16-02-89
WO-A- 8607387	18-12-86	AU-B-	597896	14-06-90
		AU-A-	6124086	07-01-87
		EP-A-	0227795	08-07-87
		JP-T-	63500007	07-01-88
EP-A- 0202758	26-11-86	AU-B-	601361	13-09-90
		AU-A-	5599886	06-11-86
		JP-A-	62000300	06-01-87
EP-A- 0269764	08-06-88	None		
WO-A- 9001069	08-02-90	EP-A-	0425563	08-05-91
WO-A- 8804301	16-06-88	FR-A-	2607507	03-06-88
		FR-A-	2612930	30-09-88
		EP-A-	0290583	17-11-88
		JP-T-	1502187	03-08-89
EP-A- 0405592	02-01-91	JP-A-	3130097	03-06-91
		JP-A-	3130098	03-06-91
EP-A- 0420260	03-04-91	AU-A-	6329090	11-04-91

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 91/00468

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB
Int.C1.5 C 12 Q 1/68

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée⁸

Système de classification	Symboles de classification
Int.C1.5	C 12 Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté⁹

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS¹⁰

Catégorie ¹¹	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
X	WO,A,8801302 -- (SISKA DIAGNOSTICS INC.) 25 février 1988, voir page 3, ligne 18 - page 4, ligne 8; page 5, lignes 29-34; page 11, ligne 32 - page 13, ligne 11; page 22, lignes 23-37; page 35, ligne 1 - page 37, ligne 22 ---	1,4-11, 16-20
A	WO,A,8607387 (AMGEN) 18 décembre 1986, voir page 8, ligne 5 - page 9, ligne 9; page 14, lignes 22-25; page 21, lignes 7-21; page 22, lignes 29-33; page 35, ligne 14 - page 36, ligne 22 ---	1-3
A	EP,A,0202758 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES) 26 novembre 1986, voir colonne 1, ligne 38 - colonne 4, ligne 15 ---	20 -/-

¹⁰ Catégories spéciales de documents cités:¹¹

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date.

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets.

IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

24-09-1991

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

14. 10. 91

Administration chargée de la recherche internationale

OFFICE EUROPEEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé

M. PEIS

M. Peis

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie ¹⁵	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
A	EP,A,0269764 (MOLECULAR BIOSYSTEMS, INC.) 8 juin 1988, voir page 7, ligne 21 - page 8, ligne 33; page 11, lignes 25-42 ---	1-3,13
A	WO,A,9001069 (SEGEN DIAGNOSTICS, INC.) 8 février 1990, voir page 35, ligne 10 - page 37, ligne 14 ---	1,13,16 -18
A	WO,A,8804301 (C.N.R.S.) 16 juin 1988, voir page 18, ligne 15 - page 19, ligne 4 (cité dans la demande) ---	12
A	Clinical Chemistry, vol. 31, no. 9, 1985, R. Polsky-Cynkin et al.: "Use of DNA immobilized on plastic and agarose supports to detect DNA by sandwich hybridization", pages 1438-1443, voir l'article en entier; particulièrement abrégé; page 1439, colonne 1, ligne 55 - colonne 2, ligne 14; figure 2 (cité dans la demande) ---	1,13-19
A	Clinical Chemistry, vol. 32, no. 9, 1986, P. Helsingius et al.: "Solid-phase immunoassay of digoxin by measuring time-resolved fluorescence", pages 1767-1769, voir page 1767, colonne 1, ligne 40 - page 1768, colonne 1, ligne 21 ---	14-19
P,X	EP,A,0405592 (SANYO CHEMICAL IND.) 2 janvier 1991, voir colonne 10, ligne 50 - colonne 11, ligne 8; colonne 12, lignes 10-20; colonne 13, ligne 40 - colonne 14, ligne 10; colonne 17, ligne 45 - colonne 18, ligne 5; colonne 20, lignes 15-37 ----	1-4
P,X	EP,A,0420260 (F. HOFFMANN-LA ROCHE) 3 avril 1991, voir page 4, lignes 7-12; page 5, lignes 15-36; page 6, lignes 25-50; page 13, ligne 30 - page 14, ligne 10 -----	1-4

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9100468
SA 48526

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 08/10/91.
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A- 8801302	25-02-88	EP-A- 0276302 JP-T- 1500461	03-08-88 16-02-89
WO-A- 8607387	18-12-86	AU-B- 597896 AU-A- 6124086 EP-A- 0227795 JP-T- 63500007	14-06-90 07-01-87 08-07-87 07-01-88
EP-A- 0202758	26-11-86	AU-B- 601361 AU-A- 5599886 JP-A- 62000300	13-09-90 06-11-86 06-01-87
EP-A- 0269764	08-06-88	Aucun	
WO-A- 9001069	08-02-90	EP-A- 0425563	08-05-91
WO-A- 8804301	16-06-88	FR-A- 2607507 FR-A- 2612930 EP-A- 0290583 JP-T- 1502187	03-06-88 30-09-88 17-11-88 03-08-89
EP-A- 0405592	02-01-91	JP-A- 3130097 JP-A- 3130098	03-06-91 03-06-91
EP-A- 0420260	03-04-91	AU-A- 6329090	11-04-91